

# 자궁경부암에서 Human Papilloma Virus 감염과 Cyclin D1 발현감소와의 연관성

동아대학교 의과대학 산부인과학교실 · 병리과학교실\*

김상진 · 노미숙\*

=Abstract=

## Association Between Infection of Human Papillomavirus and Decreased Expression of Cyclin D1 in Cervical Neoplasia

Sang-Jin Kim, M.D., Mee-Sook Roh\*

Department of Obstetrics & Gynecology, Department of Pathology\*, College of Medicine,  
Dong-A University, Busan, Korea

Cyclin D1, one of G1 cyclin gene subfamily, and human papillomaviruses (HPV) oncoprotein E7 have a homology in binding sites for the retinoblastoma tumor-suppressor protein. In order to evaluate the role of cyclin D1 in human cervical carcinogenesis, the level of its expression was measured and compared to HPV infection. In these studies, 38 normal control cases, 22 carcinoma in situ (CIN) cases, and 16 invasive cervical carcinomas were analyzed by immunocytochemistry and polymerase chain reactions for the detection of expression of cyclin D1 and infection of HPV type 16 and 18, respectively. The cyclin D1 expression was significantly lower in CIN and invasive carcinoma than normal control group regardless of HPV infection ( $p=0.026$ ). The decreased expression of cyclin D1 in normal control group was not related with HPV infection. However, the levels of expression of cyclin D1 in CIN and invasive carcinoma were correlated with HPV 16 and 18 ( $p=0.026$ ). The expression of cyclin E was not changed in HPV 16 and 18 infected cases. These data provide the evidence that cyclin D1 expression in the lesions of cervical tumor is decreased and it is related with HPV infection.

**Key Words:** Cervical carcinoma, Human papillomavirus, Cyclin D1, Cyclin E.

### I. 서 론

Cyclin 단백질들의 합성과 소멸은 세포주기의 조절에 매우 중요한 역할을 하는데 cyclin과 같은 세포주기를 조절하는 물질들의 이상은 여러 장기에서 암발생을 유발시킨다.<sup>1)</sup> 세포주기의 여러 단계에서 cyclin은 cyclin-dependent kinase (Cdk)와 결합하여 이들을 활성화시킨다.<sup>2)</sup> 이들 cyclin 중에서 cyclin D1과 E는 그 자체가 암유전자이지는 않지만 종양의 형성

과는 매우 관련이 높다.<sup>3,4)</sup> Cyclin D1은 세포주기의 G1기 후반부에 발현이 가장 증가되고 Cdk와 결합하여 G1에서 S기로의 전이를 조절하는 것으로 알려져 있고 Cyclin E는 G1 중반부에 증가하기 시작하여 G1후반에서 S기 초반에 가장 증가한다.<sup>5)</sup> 세포증식을 일으키는 주요 과정들은 세포주기의 G1기에 일어나므로 G1기에 활성화되는 cyclin과 CDK의 발현 변화가 암발생의 주요인자가 될 수 있다. Cyclin D1과 Cdk는 정상세포의 G1/S으로 전이를 마치는데 필요한 것으로 retinoblastoma 종양억제 단백질 (pRb)의

성장억제현상을 저해하는 작용을 가지고 있다.<sup>6)</sup>

Cyclin D형은 반감기가 30분 이내로 매우 짧으나 이들의 발현은 성장인자에 의하여 유도된다는 사실로서 cyclin D가 성장인자의 감지인자로서 작용을 한다고 보고되기도 하였다.<sup>7,8)</sup> 암발생과 관련하여 이들의 작용기전으로 연구된 결과로서 Cyclin D1은 pRb에 결합하며 이와 결합하는 단백질 말단부위의 염기서열은 인유두종 바이러스(human papillomavirus, HPV)의 중요전사인자인 E7유전자의 암단백질이 pRb에 결합하는 부위와 상동성을 가진 것으로 알려졌다.<sup>3,4,9-11)</sup>

자궁경부암에서 HPV감염이 암의 생성에 중요한 역할을 한다는 것은 많은 연구들에 의하여 보고되었다.<sup>12,13)</sup> 생식기에 감염되는 HPV는 암발생과 연관되어 구별하면 고위험군과 저위험군으로 나눌 수 있는데 HPV16형과 18형이 가장 고위험군에 속한다. HPV 감염은 숙주세포의 세포주기 진행을 활성화하는데 이러한 현상은 세포면역조직검사에서 세포증식 표지자인 ki-67가 핵내 증가되어 나타난다.<sup>14)</sup> 자궁경부 상피내종양에서 HPV의 감염율은 90% 이상인 것으로 알려져 있고 가장 흔한 HPV16형과 자궁경부암에서 발견되는 HPV18형이 의미있는 검사의 대상이다.<sup>15)</sup> Polymerase chain reaction (중합효소연쇄반응)과 같은 분자수준에서 HPV의 검출은 생검조직 등에서 자궁경부암의 조기진단으로 사용되고 있다. 현재 고위험 HPV감염과 저위험 HPV의 가장 특징적인 차이점으로 cyclin D1의 발현이 고위험군에서는 감소하지만 저위험군에서는 과발현된 상태로 나타난다는 것이라고 보고하였다.<sup>16)</sup>

자궁경부암 세포에서 HPV는 E6와 E7유전자를 가지고 있는데 이들은 보통은 숙주세포의 염색체에 들어가서 존재한다.<sup>17,18)</sup> E6유전자는 DNA에 결합하여 전사조절인자로 작용하고 특히 P53 암억제단백질과 결합하여 파괴시키는 작용을 가지고 있다.<sup>19,20)</sup> 그러나 아직까지 자궁경부암과 정상조직에서 나타나는 cyclin의 발현정도와 HPV감염의 연관성에 대하여는 조사된 것이 드물다.

본 연구에서는 중합효소연쇄반응을 이용한 HPV 감염의 검출과 면역조직화학적 방법으로 확인된 cyclin D1 및 E의 발현정도를 비교하여 이들의 통계적 유의성을 측정하고자 하였다.

## II. 연구 대상 및 방법

### 1. 연구대상

동아대학교부속 동아의료원 산부인과에서 1997년 1월 부터 1998년 12월 까지 내원한 환자 중에서 이전에 치료받은 적이 없는 자궁경부암 환자 16예, 자궁경부 상피내종양 환자 22예, 그리고 자궁경부에 병변이 없었던 환자 38예를 대상으로 하였다. 조직은 포르말린으로 고정한 후 포매하여 이용하였다. 파라핀 포매피로 부터 조직절편을 얻어 확진을 위한 H-E 염색과 현미경적 검사를 하였다. Cyclin D1 과 Cyclin E의 발현도를 평가하기 위하여 면역조직화학염색을 시행하였고 조직절편 일부는 DNA 추출을 위해 미세원심분리 튜브에 모아 중합효소연쇄반응을 하였다.

### 2. 면역조직화학염색

파라핀 포매피로 부터 4 mm 두께의 조직절편을 얻은 후 poly-L-lysine coated slide에 mounting한 후 슬라이드를 탈파라핀화, 재수화 과정을 시행하고 10 mM sodium citrate 용액에 넣은 후 5분 동안 전자렌지에 가열 후 흐르는 찬물에 넣었다. 모든 슬라이드에 Dako pencil로 원을 표시한 다음 10분 동안 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액에 담갔다. 슬라이드들을 normal goat serum 용액에 30분 동안 배양시킨 다음 각각 1:20과 1:40으로 희석된 cyclin D1과 E 일차 항체용액(mouse monoclonal Ab, Santa Cruz Biotechnology, 미국)에 4℃로 하룻밤 동안 배양하였다. 추가적으로 30분 동안 실온에서 배양 후 연속하여 30분 동안 실온에서 biotinylated goat anti-mouse IgG로 ABC reagent (DAKO)와 함께 배양시켰다. Hematoxylin 대조염색과 함께 chromogen으로 aminoethylcarbazole (AEC)이 사용되었다.

### 3. DNA 추출 및 HPV 검색

사용한 장비는 Perkin Elmer PCR system 9600이고 시약으로는 phosphate buffered-saline (PBS), Proteinase K (0.2mg/ml), Digestion buffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-pH 8.0, 25 mM EDTA), Phenol/Chloroform/Isoamylalcohol (25: 24: 1) 용액, 100% Ethanol, 70% Ethanol, TE buffer, 및 HPV PCR kit (Bioneer)

등을 사용하였다. 검사는 시료를 1 ml PBS로 세척하여 500 ml digestion buffer 와 500  $\mu$ g/ml proteinase K를 첨가하여 잘 섞은 후 37℃에서 16~18시간 방치시킨다. 반응이 끝난 시료에 500  $\mu$ l PCIA 용액을 첨가하여 잘 섞은 후 12000 rpm에서 10분간 원심분리시킨다. 상층액을 얻어 2배 양의 에탄올을 넣고 흔들어 DNA를 확인한 후 12000 rpm에서 10분간 다시 원심분리한다. 그리고 70% 에탄올로 세척한다. 원심분리한 상층액을 버리고 침전물을 건조시킨 다음 20 ml TE buffer에 녹여서 증합효소연쇄 반응에 이용한다. 1차 반응은 PCR kit 1차 튜브에 18 ml의 증류수를 가하여 준다. 2 ml DNA를 가해 최종 20 ml의 부피를 맞춘 후, 잘 섞고 Pre-denaturation은 94℃에서 5분간 보낸 뒤 Denaturation은 94℃에서 30초간 반응시키고 Annealing은 56℃에서 30초간 반응시키며 Extension은 72℃에서 1분간하여 총 30회 반복한다. 2차 반응은 2차 PCR에 18 ml의 증류수를 넣어준다. 그리고 1차 PCR 반응액을 2 ml 가하여 앞에서 기술한 방법을 반복한다. 결과 판독은 1.5% agarose gel를 이용하여 시료를 전기영동한 후 밴드를 확인하였다.

#### 4. 통계 처리

ANOVA test 와 student t-test를 사용하였으며 p값이 0.05 이하인 경우를 유의성이 있다고 평가하였다.

### III. 결 과

#### 1. 실험군에서 Cyclin D1의 발현조사

정상 대조군과 자궁경부 상피내종양이나 자궁경부암으로 진단된 총 76예에서 cyclin D1의 발현정도를 보기 위하여 면역조직화학염색을 하였다. Fig. 1에서 나타난 바와 같이 환자의 핵 내에 갈색으로 진하게 염색되는 세포를 양성으로 간주하였다. 중앙 병변 부위에서 양성으로 염색되는 종양 세포 수를 반정량적인 방법으로 세 등급으로 나누었는데, 병변 세포 전부가 염색이 안되거나 5% 미만에서 염색된 경우는 음성으로 판독하였고, 종양세포 중 5% 이상 1/3까지 양성을 보이면 1+, 1/3 이상 2/3 이하까지 염색되면 2+, 2/3이상의 종양세포가 염색되면 3+

인 것으로 하였다.

전체 76예 중 정상은 38예이었으며 자궁경부 상피내종양은 22예, 자궁경부암은 16예이었다. 이들 중에서 cyclin D1의 발현은 자궁경부 상피내종양 군이나 자궁경부암에서 정상 대조군에 비하여 발현이 현저히 적은 1+ 이하 검출이 되지 않을 정도의 수가 현저히 증가하여 통계적으로 유의성을 나타내었다. 정상 대조군에서는 cyclin D1의 발현이 검출되지 않은 비율이 5% 정도이었으나 자궁경부 상피내종양 군에서는 77%이었고 자궁경부암군에서는 87%인 것으로 나타났다(Table 1). 그러나 자궁경부 상피내종양군이나 자궁경부암을 서로 비교하였을 때 cyclin D1의 발현은 이들 두 군 사이에서는 큰 차이를 나타내지 않았다.

#### 2. 정상 대조군에서 HPV 16/18 감염여부에 따른 cyclin D1발현의 비교.

Fig 1. Immunohistochemical expression of cyclin D1 in cervical tissues. Cyclin D1 expression was observed in normal basal squamous epithelium and endocervical cells but was decreased in the CIN.

정상 대조군에서 HPV 감염은 총 38예 중 20예에서 나타났다. HPV 16이나 HPV 18의 감염여부는 종합효소연쇄반응으로 측정하여 291 bp크기의 밴드가 나오면 HPV 18 양성으로 하였고 255 bp크기의 밴드는 HPV 16 양성으로 판정하였다.(Fig. 2) HPV 16/18이 양성인 군에서 나타난 cyclin D1의 발현정도를 음성인 군과 비교하였을 때 2예 (10%)에서 cyclin D1의 발현이 없었으나 그 차이는 통계학적으로 유의하지 않았다.(Table 2)

### 3. HPV 16/18이 양성이거나 음성인 실험군에서 cyclin D1발현의 비교.

Table 1.에서 나타난 바와 같이 HPV 16/18의 감염여부에 관계없이 실험군에서 cyclin D1의 발현을 조사하였을 때 환자군에서는 유의성을 보였으므로 HPV 감염여부에 따라서 차이가 있는가를 평가하였다. HPV 16/18이 음성인 실험군에서 cyclin D1의 발현은 정상대조군에서 높게 나타났으나 자궁경부 상피내종양군과 자궁경부암 모두에서 매우 낮게 발현되거나 발현되지 않았다. 이들 두 군간의 차이는 현저하지 않았다. 이 결과와 마찬가지로 HPV 16/18이 감염된 경우에도 정상대조군에서는 cyclin D1의 발현이 없는 경우가 10%이었고 자궁경부 상피내종양군에서는 90%이었으며 자궁경부암에서는 100%로

현저히 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 자궁경부 상피내종양군이나 자궁경부암군에서 cyclin D1의 발현 감소는 HPV16/18이 감염여부에 관계없이 정

Fig 2. Identification of PCR products of HPV16 and HPV18 from cervical tissues with HPV16- and HPV18- specific oligonucleotide primers. Preparation of DNA and PCR were done as described in 'Materials and Methods'. HPV16/18 were not detected with specific oligonucleotide primers in figure A, lane 3 but was detected in Figure B lane 3. Lane 1, DNA size marker lane; lane 2, standard HPV 18 (band a) and 16 (band b).

Table 1. Cyclin D1 expression in study group

		Expression level of cyclin D1				Total
Status		0	1+	2+	3+	
Normal	Count (%)	2(5.3)	19(50.0)	5(13.2)	12(31.6)	38(100)
CIN	Count (%)	17(77.3)*	5(22.7)	0(0)	0(0)	22(100)
Invasive	Count (%)	14(87.5)**	2(12.5)	0(0)	0(0)	16(100)
Total	Count (%)	33(43.4)	26(34.2)	5(6.6)	12(15.8)	76(100)

\* P<0.05 (Normal vs CIN)

\*\* P<0.05 (Normal vs Invasive)

Table 2. Cyclin D1 expression in normal group according to HPV 16/18 positivity

		Expression level of cyclin D1				Total
HPV 16/18		0	1+	2+	3+	
Negative	Count (%)	0 (0.0)	9 (50.0)	2 (11.1)	7 (38.9)	18 (100)
Positive	Count (%)	2 (10.0)	10 (50.0)	3 (15.0)	5 (25.0)	20 (100)
Total	Count (%)	2 (5.3)	19 (50.0)	5 (13.2)	12 (31.6)	38 (100)

상 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하였다.  
(Table 3, Table 4)

#### 4. 자궁경부 상피내종양군과 자궁경부암에서 HPV16/18의 감염 여부에 따른 cyclin D1 발현의 변화

자궁경부 상피내종양과 자궁경부암에서 cyclin D1의 발현감소가 HPV 16/18의 감염과 관계가 있는가를 보기 위하여 이들에서 HPV 16/18이 양성이거나 음성인 경우로 나누어서 그 발현의 정도를 통계학적으로 비교하였다. Table 5에 나타낸 바와 같이 환자군에서도 정상대조군과 유사하게 HPV 16/18이

감염되는 정도는 50%정도로 나타났다. HPV 16/18 양성인 경우와 음성인 경우 모두 cyclin D1의 발현은 검출되지 않은 것으로 나타나거나 1+ 정도로 나타났다. HPV 16/18이 양성인 경우에는 검출되지 않은 정도가 95%로 나타났고 음성인 경우에는 66%이었다. 이 결과는 정상 대조군과는 다르게 HPV 16/18이 양성인 조직에서 통계적으로 유의하게 cyclin D1의 발현이 감소되었다는 것을 보여주고 있다.

#### 5. 자궁경부 상피내종양군과 자궁경부암에서 HPV16/18의 감염 여부에 따른 cyclin E 발현

Table 3. Cyclin D1 expression in study group with HPV 16/18 negative result

Expression level of cyclin D1						
Status		0	1+	2+	3+	Total
Normal	Count (%)	0(0)	9(50.0)	2(11.1)	7(38.9)	18(100)
CIN	Count (%)	7(63.6)*	4(36.4)	0(0)	0(0)	11(100)
Invasive	Count (%)	5(71.4)**	2(28.6)	0(0)	0(0)	7(100)
Total	Count (%)	12(33.3)	15(41.7)	2(5.6)	7(19.4)	36(100)

\* P<0.05 (Normal vs CIN)

\*\* P<0.05 (Normal vs Invasive)

Table 4. Cyclin D1 expression in study group with HPV 16/18 positive result

Expression level of cyclin D1						
Status		0	1+	2+	3+	Total
Normal	Count (%)	2(10.0)	10(50.0)	3(15.0)	5(38.9)	20(100)
CIN	Count (%)	10(90.9)*	1(9.1)	0(0)	0(0)	11(100)
Invasive	Count (%)	9(100)**	0(0)	0(0)	0(0)	9(100)
Total	Count (%)	21(33.3)	11(41.7)	3(5.6)	5(12.5)	40(100)

\* P<0.05 (Normal vs CIN)

\*\* P<0.05 (Normal vs Invasive)

Table 5. Cyclin D1 expression in CIN and invasive carcinoma groups according to HPV 16/18 positivity

		Expression level of cyclin D1				
HPV 16/18		0	1+	2+	3+	Total
Negative	Count (%)	12 (66.7)	6 (33.3)	0 (0)	0 (0)	18 (100)
Positive	Count (%)	19 (95.0)	1 (5.0)	0 (0)	0 (0)	20 (100)
Total	Count (%)	31 (81.6)	7 (18.4)	0 (0)	0 (0)	38 (100)

\* P<0.05 (Negative vs Positive)

## 의 변화

Cyclin D1의 발현과 병행하여 cyclin E의 발현 정도를 HPV 16/18 양성과 음성으로 나누어 비교하였을 때 통계적으로 유의성이 없었다.(Table 6) Cyclin E의 발현이 없는 경우는 HPV 16/18이 음성일 때는 44%이었으며 양성인 경우는 60% 정도로 비슷하였으며 발현의 정도가 높게 나타나는 비율도 거의 유사하였다.

## IV. 고 찰

본 연구 결과로 부터 가장 특징적으로 자궁경부상피내종양이나 자궁경부암 병변에서는 HPV감염과 cyclin D1의 발현의 감소가 일치한다는 결과를 얻었다. cyclin D1은 HPV와 함께 암발생에 관여하는 물질로 알려져 있으나 그 발현되는 정도는 여러 연구자들에 의하여 다른 결과를 보이고 있다. 자궁경부암을 포함한 경우에서와 같이 HPV가 감염된 DNA바이러스에 감염된 세포주에서 cyclin D1의 mRNA나 단백질의 발현은 감소되어 있다고 보고하였으나 유방암, 난소암, 및 방광암 등의 여러 다른 종양에서는 cyclin D1의 발현은 오히려 증가한다는 보고도 있었다.<sup>6,10,21-24)</sup>

이번 연구에서 나타난 결과로서 HPV의 감염과는 상관없이 HPV가 음성이거나 양성일 때 모두 자궁경부 상피내종양이나 자궁경부암에서 cyclin D1의 발현이 감소한다는 것은 HPV이외 다른 인자들에 의하여 암발생이 촉진된다는 것을 시사하는데 이것은 cyclin D1 발현의 감소를 유발하거나 혹은 cyclin D1의 발현 감소에 의한 영향으로 나타날 수 있다는 것을 배제할 수 없다. HPV의 E6 단백질은 p53 종양 억제단백질과 결합하고 이에 결합된 p53은 p21

(Waf-1)의 전사를 촉진하여 cdk활성을 억제하는 것으로 알려져 있다.<sup>25,26)</sup>

그러나 이러한 결과와 비교하여 HPV가 양성인 경우에서만 cyclin D1의 발현 변화를 조사하였을 때는 발현되지 않는 경우가 99%로서 나타났으나 발현되는 경우는 66% 정도로 통계적 유의성을 나타내었다. 따라서 이러한 결과는 HPV양성인 경우에서 cyclin D1의 발현이 더욱 감소한다는 것을 나타낸다. 고위험 HPV 16/18의 감염율과 비교하여 병변에서 cyclin D1의 발현이 감소하는 것이 일치하는 것에 대하여 Southern 등은 고위험 HPV에 의한 세포의 변형에서 세포주기의 조절 이상에 의한 이상유전자의 축적이 중요한 원인이 될 것이라고 추측하였다.<sup>16)</sup> 자궁경부암에서 나타난 이러한 결과는 HPV16이나 18을 과발현시킨 사람의 keratinocyte세포에서는 세포주기 G1으로 이행되는데 cyclin D1이 더 이상 필요하지 않다는 in vitro 결과와 비교할 만하다.<sup>10)</sup> HPV 양성인 조직에서 cyclin D1이 감소되어 나타날 수 있는 가능성으로는 단백질의 분해, 단백질 발현에서 번역과정의 이상, 혹은 바이러스 감염에 의한 면역반응이 감소되는 등이 제시되고 있다.<sup>27)</sup> 한편, 본 연구의 정상대조군에서 발현되는 cyclin D1의 경우에도 면역조직화학법으로 3+에서 전혀 축적이 되지 않는 정도까지의 검출이 되었으므로 자궁경부암에서 감소된 cyclin D1의 발현은 측정상 감수성이 낮으므로써 생기는 가능성은 배제하여도 무방할 것이다. 본 연구결과와 함께 바이러스에 의하여 변형된 세포에서는 cyclin D1의 발현이 감소된다는 다른 연구자들의 결과는 G1/S의 세포주기 전이에 바이러스의 암단백질이 필요하다는 것을 시사하고 있다.<sup>10)</sup> 또한, cyclin D1이 감소되는 경우를 정상 대조군에서 HPV감염이 있는 경우와 없는 경우로 구분하여 비교하였을 때 자궁경부암과는 다

Table 6. Cyclin E expression in CIN and invasive carcinoma groups according to HPV 16/18 positivity

		Expression level of cyclin E				
HPV 16/18		0	1+	2+	3+	Total
Negative	Count (%)	8 (44.4)	7 (38.9)	1 (5.6)	2 (11.1)	18 (100)
Positive	Count (%)	12 (60.0)*	3 (15.0)	2 (10.0)	3 (15.0)	20 (100)
Total	Count (%)	20 (52.6)	10 (26.3)	3 (7.9)	5 (13.2)	38 (100)

\* P<0.05 (Negative vs Positive)

르게 통계적으로 유의성을 나타내지 못한 것은 단순히 HPV의 감염에 의하여 형질이 변형된 세포에서는 G1으로의 전이에 cyclin D1이 더 이상 필요하지 않다는 사실보다는 cyclin D1의 발현이 HPV에 의하여 다른 영향을 받는다는 것을 시사한다.

Cyclin과 관계하여 HPV의 분자적 기전을 설명하는데 있어서 다른 연구자들은 HPV의 E7유전자가 pRb와 결합하여 E2F 전사인자를 분리시킴으로써 HPV감염은 결국 Rb의 기능소실을 초래한다고 제안하였다.<sup>28)</sup> Rb단백질의 기능이 소실되는 다른 경우는 cyclin D1-CDK4의 활성이 높을 때 Rb단백질의 인산화에 의하여 이루어 진다고도 알려져 있다.<sup>29)</sup> 본 연구에서와 같이 Nichols등은 HPV가 양성인 자궁경부 편평상피종에서 면역조직학적으로는 cyclin D1의 발현이 증가된다는 것은 증명하지 못하였고 다만 in vivo에서 in situ hybridization으로 mRNA의 증가를 관찰하였다.<sup>6)</sup> 본 연구의 결과 나타난 cyclin D1의 감소현상은 HPV E7과 cyclin D1의 Rb에 대한 작용을 고려할 때 HPV감염으로 인한 이들 E7 단백질의 Rb에 대한 결합으로 인하여 cyclin D1의 발현이 영향받을 수 있다. 즉 HPV나 다른 세포주기를 조절하는 인자들에 의하여 세포주기의 조절의 이상과 이에 관여하는 autoregulatory feedback의 파괴를 유발에 의한 것이라고 생각할 수 있다.

Cyclin D1의 변화와 함께 조사한 결과에서 cyclin E의 발현은 HPV의 감염과 상관성이 없다는 것은 cyclin D1발현의 변화가 cyclin E의 변화와는 관계가 없다는 것을 간접적으로 나타내고 있다. Cho 등의 연구결과 HPV가 양성인 경우 cyclin E의 발현은 현저히 증가한다고 하였다.<sup>30)</sup> 그들은 cyclin의 발현 정도를 측정하는데 있어서 1000개의 세포 당 핵에서 염색이 되는 세포를 측정하는 cyclin index를 사용하므로써 본 연구와 비교하는 측정의 범위가 다르기 때문에 이러한 차이를 나타낸 것으로 보인다.

비록 자궁경부암에서 cyclin D1의 발현감소가 어떠한 분자적 기전을 나타내는가는 아직 확실하지는 않지만 본 연구에서는 HPV 감염에 관계하여 자궁경부 상피내종양이나 자궁경부암과 상관성을 가진다는 것을 밝힘으로써 질병의 진단적 가치와 치료에 대한 판단기준을 제시할 수 있을 것으로 본다.

## V. 결 론

동아대학교 의과대학 동아의료원 산부인과에서 1997년 1월부터 1998년 12월까지 내원한 환자 중에서 이전에 치료받은 적이 없는 자궁경부암 환자 16예와 자궁경부 상피내종양 환자 22예, 그리고 자궁경부에 병변이 없었던 환자 38예를 대상으로 하여 세포주기 인자인 cyclin D1과 cyclin E의 발현도를 HPV 16/18 감염여부와 비교조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 면역 조직화학염색법을 이용하여 cyclin D1의 발현도를 조사하여 본 결과 HPV 16/18에 관계없이 대조군에서 5.3%의 음성율을 자궁경부암군에서 87.5%의 음성율을 나타내어 통계학적으로 아주 의미있는 차이를 보였다. 그러나 자궁경부 상피내종양군과 자궁경부암군에서 cyclin D1의 발현도는 의미있는 차이가 없었다.
2. HPV 16/18에 대한 양성군과 음성군으로 나누어 cyclin D1의 발현 정도를 조사한 결과 양성군에서 모두 자궁경부 상피내종양이나 자궁경부암인 경우, 대조군보다 cyclin D1의 발현이 통계학적으로 유의하게 나타났다.
3. HPV 16/18이 cyclin D1의 발현과 연관성이 있는가를 알아보기 위하여 자궁경부에 병변이 없었던 정상 대조군에서 HPV 16/18의 양성 혹은 음성에 따른 cyclin D1 발현도의 차이를 비교한 경우 유의성이 없는 것으로 나타났다.
4. 자궁경부 상피내종양이나 자궁경부암에서 HPV 16/18인 양성인 경우에 cyclin D1의 발현이 되지 않은 경우가 95%로서 HPV16/18인 음성인 경우 (66%) 보다 높았다. 이는 통계학적으로 유의하게 나타났다.
5. HPV 16/18 양성 및 음성에 따른 자궁경부 상피내종양군과 자궁경부암군의 cyclin E 발현도의 차이는 통계학적으로는 의의가 없는 것으로 나타났다.

이상의 결과로 HPV 16/18의 감염에 관계없이 cyclin D1은 정상조직에 비하여 자궁경부 상피내종양군과 자궁경부암군에서 낮게 발현되고 이들 병변

에서 cyclin D1의 변화는 HPV에 의하여 더욱 영향을 받는다는 것을 알 수 있다. 따라서 cyclin D1의 감소가 병변의 진행과 관계가 있고 이에는 HPV의 감염이 관여한다는 것을 시사한다.

- 참고문헌 -

1. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitian SV, Stockert E, Day RS 3rd, Johnson BE, Skolnick MH: A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994;264:436-40.
2. Hunter T, Pines J: Cyclins and cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 1994;79:573-82.
3. Arroyo M, Bagchi S, Raychaudhuri P: Association of the human Papillomavirus type 16 E7 protein with the S-phase specific E2F-cyclin A complex. *Mol Cell Biol* 1993;13:6537-46.
4. Doeberitz MK, Rittmuller C, Aegeneyndt F, Jansen-Durr P, Spitkovsky D: Reversible repression of papillomavirus oncogene expression in cervical carcinoma cells: consequences for the phenotype and E6-P53 and E7-pRB interactions. *J Virol* 1994;68:2811-21.
5. Sherr CJ: G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 1994;79:551-5.
6. Lukas J, Pagano M, Staskova Z, Draetta G, Bartek J: Cyclin D1 protein oscillates and is essential for cell cycle progression in human tumour cell lines. *Oncogene* 1994;9:707-18.
7. Matsushima H, Roussel M, Ashmun RA, Sherr CJ: Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell* 1991;65:701-13.
8. Winston JT and Pledger WJ: Growth factor regulation of cyclin D1 mRNA expression through protein synthesis-dependent and independent mechanisms. *Mol Cell Biol* 1993;4:1133-44.
9. Lam EW, Morris JD, Davies R, Crook T, Watson RJ, Vousden KH: HPV 16 E7 oncoprotein deregulates B-myb expression: correlation with targeting of p107/E2f complexes. *EMBO J* 1994;13:871-8.
10. Lukas J, Muller H, Bartkova J, Spitkovsky D, Kjeruff AA, Jansen-Durr P, Strauss M, Bartek J: DNA tumor virus oncoproteins and retinoblastoma gene mutations share the ability to relieve the cell's requirement for cyclin D1 function in G1. *J Cell Biol* 1994;125:625-38.
11. Imai Y, Matsushima Y, Sugimura T, Terada M: Purification and characterization of human papillomavirus type 16E7 protein with preferential binding capacity to the underphosphorylated form of retinoblastoma gene product. *J Virol* 1991;65:4966-72.
12. Crum CP: Genital papillomavirus and related neoplasms: Causation, diagnosis, and classification. *Mod Pathol* 1994;7:138-45.
13. Wright TC, Kurman RJ, Ferenczy A: Precancerous lesions of the cervix. In Blaustein's pathology of the female genital tract, edited by Kurman RJ, Ed 4, pp229-278. New York, Springer-Verlag, 1994.
14. Resnick M, Lester S, Tate JE, Sheets EE, Sparks C, Crum CP: Viral and histopathological correlates of MN and MIB-1 expression in cervical intraepithelial neoplasia. *Hum Pathol* 1996;27:234-9.
15. Lorincz AT, Reid R, Jenson AB, Kurman RT: Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk association of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 1992;79:328-37.
16. Southern SA, Herrington CS: Differential cell cycle regulation by low- and high-risk human papillomaviruses in low-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Cancer Research* 1998;58:2941-45.
17. Schneider-Maunoury S, Croissant O, Orth G: Integration of human papilloma virus type 16 DNA sequences: a possible early event in the progression of genital tumors. *J Virol* 1987;61:3295-8.
18. Schwarz EU, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, zur Hausen H: Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 1985;314:111-4.
19. Androphy EJ, Hubbert NL, Schiller JT, Lowry DR: Identification of the HPV-16 E6 protein from transformed mouse cells and human cervical carcinoma cell lines. *EMBO J* 1987;6:989-92.
20. Crook T, Tidy JA, Vousden KH: Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation. *Cell* 1991;67:547-56.
21. Schuurig E, Verhoeven E, Mooi WJ, Michalides RJ: Identification and cloning of two overexpressed genes, U21B31/PRAD1 and EMS1, within the amplified chromosome 11q13 region in human carcinomas. *Oncogenes* 1992;7:355-61.
22. Karlseder J, Zeillinger R, Schneeberger C, Czerwenka K, Speiser P, Kubista E, Birnbaum D, Gaudray P, Theillet C: Patterns of DNA amplification at band q13 of chromosome 11 in human breast Cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 1994;9:42-8.
23. Proctor AJ, Coombs LM, Cairns JP, Knowles MA: Amplification at chromosome 11q13 in transitional cell



- tumours of the bladder. *Oncogene* 1991;6:789-95
24. Foulkes WD, Campbell IG, Stamp GW, Trowsdale J: Loss of heterozygosity and amplification on chromosome 11q in human ovarian cancer. *Br J Cancer* 1993; 67:268-73.
  25. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM: The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990;63:1129-36.
  26. Marx J: How p53 suppresses cell growth. *Science* 1993;262:1644-5.
  27. Nichols GE, Williams ME, Gaffey MJ, Stoler MH: Cyclin D1 gene expression in human cervical neoplasia. *Mod Pathol* 1996;9:418-25.
  28. Scheffer M, Munger K, Huibregtse JM, Howley PM: Targeted degradation of the retinoblastoma protein by human papillomavirus E7-E6 fusion proteins. *EMBO J* 1992;11:2425-31.
  29. Dowdy SF, Hinds PW, Louie K, Reed SI, Arnold A, Weinberg RA: Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell* 1993;73:499-511.
  30. Cho NH, Kim YT, Kim JW: Correlation between G1 cyclins and HPV in the uterine cervix. *Int J Gynecol Path* 1997;16:339-47.
-